Agilent バイオモノリス HPLC カラムを使用したバクテリオファージ発酵工程のモニタリング作業の高速化

アプリケーション

バイオ医薬品

著者

Franci Smrekar, Aleš Podgornik,
Mateja Ciringer, and Lidija Urbas
BIA Separations
Teslova 30
SI-1000 Ljubljana
Slovenia

Peter Raspor
Department of Food Science and
Technology, Biotechnical Faculty
University of Ljubljana
Jamnikarjeva 101
SI-1000 Ljubljana
Slovenia

Taegen Clary
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA 95052
USA

概要

細菌に感染するウィルスであるバクテリオファージ (通称: ファージ) は 20 世紀初頭に発見されました。現在、ファージは、抗菌剤として使用されているだけでなく、ファージのディスプレースクリーニング、ファージデリバリーワクチンの開発、標的化遺伝子治療における導入技術、細菌の型別判定の分野などでも使用されています。こうした応用分野でファージを使用するには、通常、液体クロマトグラフィでファージを精製して不純物をすべて取り除く必要があります。最近、イオン交換モノリスカラムを使用した精製・濃縮プロセスが開発されました [1]。増殖後、宿主細菌の溶菌が終わると、ファージは増殖培地に放出されます。このとき、ファージとともに宿主の他の細胞成分も増殖培地に放出されることになります。そうした成分のうちの 1 つがゲノム DNA (gDNA) で、すぐに小さな断片に分解しはじめることから問題視されている物質です。イオン交換クロマトグラフィでファージを精製するときには、ファージの培地に DNA の断片が一切混入していないことが絶対条件です。遊離 DNA の断片は、in vitro ファージの用途 (ファージディスプレーや細菌型別判定) においては干渉の原因となり、治療的なファージの用途 (ワクチン製造や遺伝子導入) においては有毒化の原因となるものです。Agilent バイオモノリス DEAE カラム (弱陰イオン交換) は、発酵工程のモニタにも、精製工程全体を通じた gDNA 分解量の評価にも使用できます。

Agilent Technologies

はじめに

Agilent バイオモノリス DEAE HPLC カラムは、モノリスカラムによる分析・精製がバクテリオファージ発酵工程のモニタに利用できることを実証しているカラムです。バイオモノリス DEAE カラムによって得られる高速で高品位な分析分離能力により、発酵工程の制御やファージ粒子の効率的な精製が可能になります。バイオモノリス DEAE カラムでファージ菌液の濃度 (gDNA のピーク高さ) のモニタリングにより、最適な発酵終点を素早く判断できるようになります。gDNA の濃度が最大値に達したところで発酵工程を止めれば、そのままイオン交換クロマトグラフィで精製処理できる品質のサンプルができあがります。

実験手法

HPLC 条件

カラム	Agilent バイオモノリス DEAE カラム (5.2 mm (内径) × 4.95 mm)、P/N 5069-3636
移動相 A	125 mM のリン酸緩衝液、pH 7.0
移動相 B	125 mM のリン酸緩衝液 + 1 M の NaCl、pH 7.0
グラジエント	直線的なグラジエント: 100% 緩衝液 A (2.5 分)、0〜100% 緩衝液 B (10 分)、100% 緩衝液 A (2 分)
検出	280 nm の UV
流量	1 mL/min
HPLC システム	高圧グラジエント HPLC システム、Agilent 1200

Agilent バイオモノリスカラム (左)、
バイオモノリスカラムのハウジングとモノリスディスク (右)

結果と考察

実験用バイオリアクター内で 16 分間発酵させた LB (ルリア-ベルターニ) 培地に大腸菌を接種しました。T4 ファージは、70 分の時点で追加接種し、増殖させました。図 1a は、在来型のセンサ (pO2 電極と pH 電極) で発酵過程をモニタしたグラフで、発酵の推移を極めておおまかに示したものです。在来型のセンサでは pH 値の僅かな低下しか検出できませんが、バイオモノリス DEAE カラム (図 1b) を使用すれば、最初の 36 分間で発酵培地液の組成に起こった重大な変化を観察できます。図 1b のピーク 1 の低下は、元の培地成分の減少と、それに伴う大腸菌細胞の増加を示しています。ピークの低下 (大腸菌の増加) が確認できれば、ファージの追加時期と追加量を調節してファージの最終収量を最大限に高めることができます。

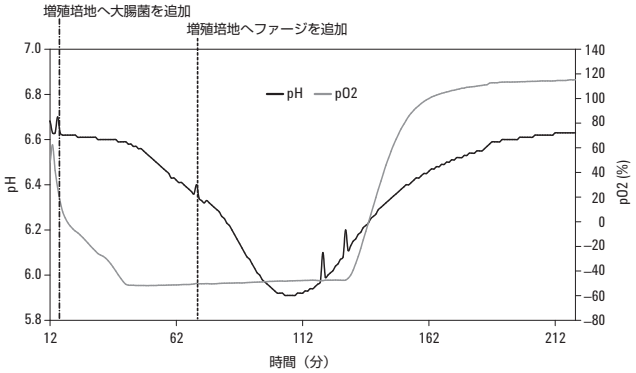

図 1a. バイオリアクターにおける T4 ファージの増殖のモニタリング16 分の時点で LB 培地に大腸菌を接種し、70 分の時点で T4 ファージを追加しました

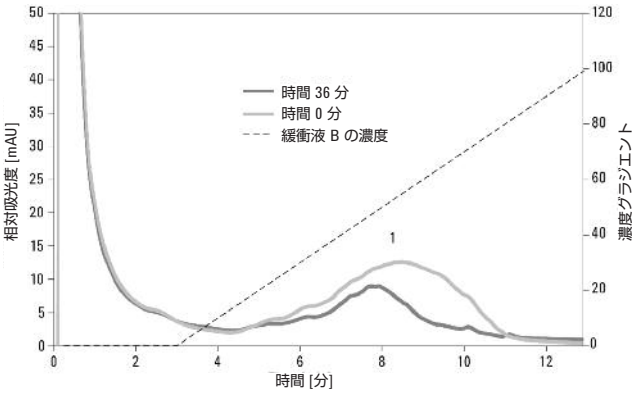

図 1b. 開始 (0 分) 時点と大腸菌接種から 36 分後 (1) の培地液のクロマトグラムプロフィール
培地が大腸菌に浸食されるにつれ、ピークが低くなっていきます

70 分時点のファージの追加により、細胞溶解が始まり、宿主細胞からファージが放出されます。図 2a および図 2b に示したバイオモノリス DEAE カラムを使用してファージの増殖と gDNA の濃度をモニタしました。無傷のファージと一緒に gDNA も細胞から放出されています (図 2a のピーク 2)。時間の経過とともに宿主細胞の溶解数が拡大してファージの数が増加し (図 2a のピーク 1)、gDNA の濃度が上がります (図 2a のピーク 2)。ファージと gDNA 濃度の増加に伴って、ファージと共溶出する他の不純物 (培地成分や細胞成分) が時間を追うごとに減っていきました (図 2 のピーク 1)。こうした共溶出不純物の濃度が下がれば、発酵後の精製作業が格段に楽になります。ピーク 1 (図 2b) の画分にファージが含まれていることは溶菌斑分析によって確認されています。しかし、HPLC の検出限界を下回る濃度であったため、(図 2b の) ピーク 1 の上昇となって現れることはありませんでした。発酵の終盤に向かい (158〜191 分)、放出された gDNA が DNA 断片に分解しはじめます (図 2b のピーク 3)。

前述の通り、断片化した gDNA をイオン交換方式の精製で除去することはできません。したがって、この場合、158 分の段階で発酵作業を止めれば、イオン交換精製を経た最終的なファージサンプルは、ほとんど gDNA 断片の混入していない純度の高いものになります。

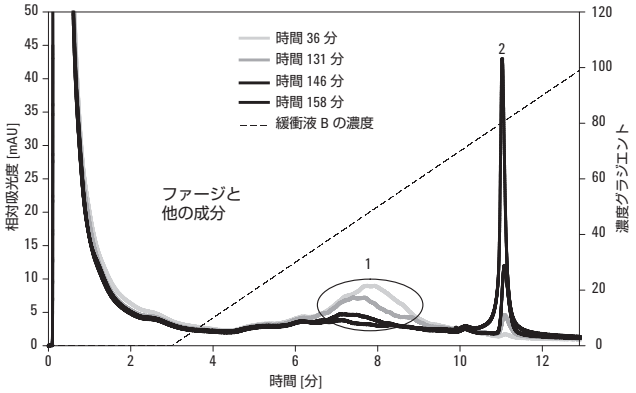

図 2a.　ファージ / 細胞 / 培地液成分の共溶出ピーク (1) と gDNAのピーク (2)

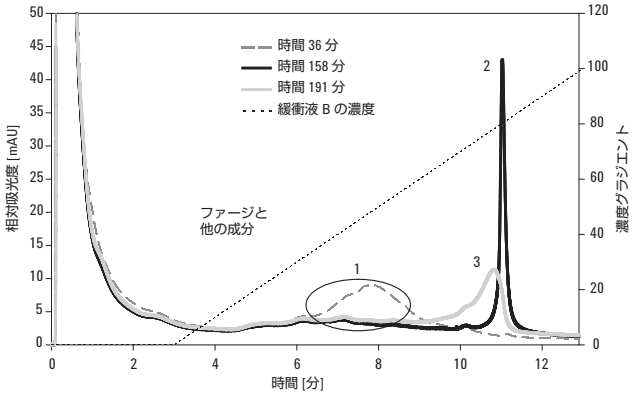

図 2b.　ファージと不純物の共溶出ピーク (1)、gDNA のピーク (2)、および gDNA 断片のピーク (3)

結論

Agilent バイオモノリス DEAE カラムは、発酵工程全体を通じたファージの増殖状況のモニタに効果的に利用できます。このカラムによって発酵工程をモニタすることにより、発酵工程をその後の精製に最適なポイントで止めることができるようになります。こうしたメソッドは、発酵工程の初期の開発段階で利用することも、その後の発酵工程のモニタリングや品質管理に利用することもできます。

参考文献

1.　F. Smrekar, M. Ciringer, M. Peterka, A. Podgornik, and A. Štrancar, *J. Chromatogr. B,* 861(2008) 177–180

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
January 12, 2009
5990-3247JAJP

Agilent Technologies